

(Aus der medizinischen Klinik der kgl. ung. Franz Joseph Universität
in Szeged-Ungarn [Direktor: o. ö. Prof. Dr. St. Rusznyák].)

Die Wirkung des Vitamins C auf einige Antigen-Antikörperreaktionen. (Hämoglobinurie, Immunhämolyse, Wa.R.).

Von

Dr. L. Armentano und Dr. A. Hámori.

(Eingegangen am 25. September 1937.)

In einer früheren Mitteilung berichteten wir über einen Fall von paroxysmaler Hämoglobinurie — mit nachweisbarem, ausgeprägtem Vitamin-C-Defizit — bei dem nach der Verabreichung von Vitamin C nicht nur die spontanen Anfälle aufgehört hatten, sondern auch die *Ehrlichsche* Probe negativ wurde, d. h. die Anfälle konnten auch durch die künstliche Abkühlung der unteren Extremitäten nicht mehr ausgelöst werden. Der Kranke, der sich auch weiter in unserer Beobachtung befindet, ist nunmehr seit 1,5 Jahren symptomfrei. Die Fähigkeit der Ascorbinsäure, die intravitale Hymolyse zu verhindern, ließ sich nicht nur in vivo sondern auch in vitro nachweisen. Wir konnten nämlich zeigen, daß diese Wirkung des Vitamins C in vivo auf der Verminderung der Menge des Autohämolsins, in vitro auf der vollständigen Neutralisierung desselben beruhe. Bei demselben Kranken blieb die Wa.R. nach der Sättigung des Organismus mit Vitamin C 4 Wochen hindurch negativ, hierauf betrug der Grad der Komplementbindung wochenlang bloß ++.

Zunächst dachten wir, diese Wirkung des Vitamins C habe allgemeine Gültigkeit, um so mehr, da *Lotze* über ein ähnliches Ergebnis berichtete; wir wurden jedoch alsbald eines anderen belehrt. Bei dem nächsten Fall von paroxysmaler Hämoglobinurie blieb die Vitamin C-Behandlung wirkungslos: nachdem dem Kranken in 3 Wochen täglich 300 mg Ascorbinsäure intravenös verabreicht worden waren, blieben die Anfälle unverändert, bloß der Titer der *Donath-Landsteinerschen* Reaktion wies auf eine Besserung hin: vor der Behandlung in der Verdünnung 1:4, nach der Behandlung bloß 1:2 positiv. Auch die Wa.R. wurde in diesem Falle durch die Ascorbinsäure in negativer Richtung nicht beeinflusst: sowohl vor wie nach der Behandlung in der Verdünnung 1:10 = ++++, nach der Sättigung steigt der Titer auf 1:640.

Da sich die Behandlung mit Vitamin C nicht bei jedem an paroxysmaler Hämoglobinurie leidenden Kranken als erfolgreich erweist, schien es uns angezeigt, die Wirkung des Vitamins C auch in bezug auf andere Antigen-Antikörperreaktionen zu untersuchen, um die Frage des Wirkungsmechanismus womöglich zu klären.

Neben der Wirkung der Ascorbinsäure auf die Kälte-Hämolyse konnten wir den hemmenden Einfluß derselben auf die Immunhämolyse nachweisen; unsere Versuche nahmen folgenden Verlauf:

Von Hämolysin wurden mehrere Verdünnungsserien angelegt. Nach dem Hinzufügen der Hammelblutkörpersuspension brachten wir in jedes Röhrchen je einer Serie die gleiche Menge des in 0,5 ccm physiologischer Kochsalz gelösten Vitamins C, fügten hierauf Komplement hinzu und ergänzten schließlich mit physiologischer Kochsalzlösung das ganze auf 2,5 ccm. Das Hämolysin wurde somit in Gegenwart von 4—2—1 mg usw. bis 0,05 mg Ascorbinsäure titriert. Je nach der Haltbarkeit der aus verschiedenen Herstellungsserien stammenden Hämolysine, der verschiedenen Konzentration der Hammelblutsuspension und der wechselnden Resistenz der roten Blutkörperchen erwiesen sich 1,0, 0,5 oder 0,25 mg Ascorbinsäure wirksam, wodurch das Hämolysin mit dem Titer 1:3200 die roten Blutkörperchen bloß in der Verdünnung von 1:200 oder z. B. ein anderes Hämolysin mit dem Titer 1:6400 diese bloß in der Verdünnung von 1:1600 zu lösen imstande war. Größere Mengen der Ascorbinsäure bewirkten Lösung der roten Blutkörperchen neben Bildung von Säurehämatin; kleinere Mengen blieben wirkungslos auf die Immunhämolyse. Zu erwähnen ist hier, daß wir anfangs eine 5%ige Blutkörperchensuspension verwendet hatten (5 ccm defibrinierten Blutes auf 100 ccm berechnet) später wurden 2,5 ccm gewaschener roter Blutkörperchen mit physiologischer Kochsalzlösung auf 100 ccm aufgeschwemmt. Da die Hämolysefähigkeit des Amboceptors in Gegenwart von 0,5 ccm und 1,0 ccm Komplement in gleicher Weise gesunken war, schien es wahrscheinlich, daß die hemmende Wirkung des Vitamins C auf die Immunhämolyse, vornehmlich auf der Schädigung des Hämolysins beruhe.

Es war ferner noch die Frage zu entscheiden, ob die Ascorbinsäure nicht etwa auch das Komplement schädige. Zu diesem Zweck wurden Hammelblutkörperchen die mit dem 4fachen der geringsten, eben noch lösenden Menge des Hämolysins sensibilisiert worden waren, in Röhrchen gebracht, die wir in drei Reihen aufstellten. In jeder Reihe wurde zu dem hämolytischen System 4 mg, 2 mg, 1 mg usw. 0,5 mg Vitamin C hinzugefügt und dann die Hemmung in der ersten Reihe in Gegenwart von 0,5 ccm Komplement in der zweiten in Gegenwart von 0,5 ccm des $\frac{1}{2}$ Stunde lang bei 56° C inaktivierten Meerschweinchenserums + 0,5 ccm Komplement und in der dritten von 1,0 ccm Komplements und bei 2,5 ccm Gesamtmenge untersucht. Das Ergebnis wurde abgelesen, sobald die sensibilisierten roten Blutkörperchen durch 0,5 ccm Komplement in dem Kontrollröhrchen vollkommen gelöst worden waren. Wir konnten feststellen, daß die hemmende Wirkung des Vitamins C auf die Immunhämolyse bei derselben Menge zustande kommt, mag man 0,5 ccm oder 1,0 ccm Komplement verwendet haben. Bei der Verwendung von

1 ccm macht jedoch die Hämolyse — im Gegensatz zu den 0,5 ccm Komplement — später noch weitere Fortschritte, was dafür spricht, daß durch Vitamin C auch das Komplement bis zu einem gewissen Grade geschädigt wird, doch wird diese schädigende Wirkung durch den Überschuß an Komplement wieder ausgeglichen. Bei der Bewertung dieses Ergebnisses ist noch ein anderer Umstand zu beachten: In dem Röhrchen nämlich, das 0,5 ccm aktives 0,5 ccm inaktives Komplement enthält, macht die Hämolyse ebenfalls Fortschritte, allerdings nicht in dem Maße, wie bei 1 ccm Komplement. Bei der Neutralisierung der Wirkung des Vitamins C spielt somit nicht bloß der Komplementüberschuß eine Rolle, sondern auch der Umstand, daß die Ascorbinsäure durch 1 ccm Meerschweinchen-serum erfolgreicher gepuffert wird als durch 0,5 ccm Meerschweinchen-serum.

Da sich auf die Einwirkung der Ascorbinsäure in gewissen Konzentrationen Säurehämatin bildet, wiederholten wir die Versuche mit gepuffertem Vitamin C; dieses war jedoch nicht imstande, die Hämolyse zu vereiteln. Zur Pufferung verwendeten wir primäre und sekundäre Phosphatlösung (91,5 ccm m/15 Na_2HPO_4 und 8,5 ccm m/15 KH_2PO_4 mit einer p_H von 7,8), wobei 50 mg Ascorbinsäure in 15 ccm Pufferlösung gelöst wurden. Durch diese Pufferlösung wurde die Immnhämolyse nicht beeinträchtigt. Die hemmende Wirkung des Vitamins C auf die Hämolyse in vitro beruht demnach auf einer Säurewirkung, der gegenüber hauptsächlich der Amboceptor, in geringerem Grade aber auch das Komplement empfindlich ist.

Weitere Untersuchungen ergaben, daß Vitamin C keine wesentliche zerstörende Wirkung auf das Komplement ausübt. Zu dieser Feststellung gelangten wir an der Hand folgender Versuche: Kaninchen erhielten 6 Tage hindurch täglich je 200 mg Ascorbinsäure intravenös in 10 ccm physiologischem Kochsalz gelöst; vor und nach der Behandlung wurden der Komplementgehalt im Blute der Tiere bestimmt. Das Blut wurde der Ohrvene entnommen. Es ist wichtig, zu den intravenösen Injektionen jeweils eine andere Vene zu verwenden, da diese infolge der Vitamin-C-Injektion leicht thrombotisieren bzw. in Entzündung geraten kann, wodurch das Ergebnis beeinträchtigt wird. Diese Versuche zeigten, daß sich der Komplementgehalt des Blutes trotz der Einfuhr so gewaltiger Mengen Vitamins C kaum ändert. Der Komplementgehalt des Blutes in vivo wird somit durch Vitamin C nicht geschädigt, allerdings auch nicht gesteigert. Der letztere Umstand erhellt aus jenen Versuchen, bei denen wir das zur Komplementbestimmung nötige Blut vor dem Versuch durch Herzpunktion gewonnen hatten. Die ungünstige Wirkung dieses Eingriffs gelangte sowohl bei den Versuchs- wie auch bei den Kontrolltieren in gleicher Weise zur Geltung: es kam zur vorübergehenden Gewichtsabnahme und in jedem Falle zur starken Senkung des Komplementgehaltes des Blutes. In den beiden oben erwähnten Fällen von paroxys-

maler Hämoglobinurie wurde der Komplementgehalt des Blutes ebenfalls öfters bestimmt und zwar bei der Aufnahme auf die Klinik, auf dem Höhepunkt der Sättigung mit Vitamin C und beim Aussetzen der Behandlung; es zeigten sich keine wesentlichen Schwankungen. Die Komplementmenge entsprach stets 0,03—0,04 ccm Nativserum, also so viel, wie wir bei unserer Versuchseinrichtung als normal ansprechen. Zur Titration des Komplements verwendeten wir die Suspension von Hammelblutkörperchen, die mit dem 4fachen der geringsten, eben noch lösenden Hämolsinmenge sensibilisiert worden waren. Die hämolytische Fähigkeit des Amboceptors wurde in Gegenwart von 5% Blutkörperchensuspension und 1 ccm 20fach verdünntem Meerschweinchenserum festgestellt. Das Versuchsserum verdünnten wir zunächst auf das 5fache (Kaninchen) bzw. 10fache (Mensch) und fügten es in von 0,1 ccm aufsteigenden Mengen dem hämolytischen System hinzu. Schließlich wurde der Inhalt der Röhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung auf 2,5 ccm ergänzt. Beim Ablesen galt als Maß der Komplementmenge des Blutes jenes Röhrchen, in dem sich die Hämolyse im 37-C°-Wasserbad in 30 Min. vollständig eingestellt hat. Da sich bekanntlich die Komplementwirkung des Blutes in den ersten Stunden nach der Blutentnahme ändert, wurde das Serum zunächst in den Eisschrank gestellt und die Bestimmung erst 6 Stunden nach der Blutentnahme ausgeführt.

Nach unseren Versuchen wird also der Komplementgehalt des Blutes durch Vitamin C in vivo nicht beeinträchtigt, im Gegensatz zu *Capelli*, der bei 10 Individuen während der Verabreichung von Ascorbinsäure eine deutliche und dauernde Zunahme des Blutkomplementgehaltes fand, insbesondere in jenen Fällen, wo vor dem Versuch niedrige Werte bestanden hatten.

In Zusammenhang mit der Beobachtung der an paroxysmaler Hämoglobinurie leidenden Kranken entstanden mehrere Fragen, von denen uns am meisten interessierte, ob die Wa.R. auch bei anderen luischen Individuen durch Ascorbinsäure beeinflusst werden könne. Wir verabreichten daher Kranken mit positiver Wa.R. solange je 300 mg Ascorbinsäure intravenös, bis die Sättigung erreicht war. Hatte sich die Wa.R. auch dann noch nicht geändert, dann setzten wir die Behandlung weitere 2—3 Wochen fort, um die Vitamin-C-Menge im Blut auf ständiger Höhe zu erhalten. Auf diese Weise wurde die bis dahin stark positive Wa.R. — außer in dem schon erwähnten Fall — unter 32 Kranken in noch 3 Fällen negativ. Aus der Krankengeschichte dieser 3 Fälle.

1. 28 Jahre alte Tagelöhnersfrau. Am 14. 2. 36 wegen Magenbeschwerden der Klinik zugewiesen. Bei der Aufnahme unter anderem Anisokorie, lichtstarre Pupillen, am 15. 2. Wa.R. + + + +. Bisher noch keine antiluische Behandlung. Nach der dritten Vitamin-C-Injektion Sättigung; Unterbrechen der Behandlung. Am 20. 2. Wa.R. negativ, am 22. 2. Wa.R. + +, am 1. 3. Wa.R. abermals + + + +.

2. 60 Jahre alter Arbeitsaufseher. Anfallsweise auftretende Magenschmerzen. Bei der Aufnahme ohne Befund am 2. 12. 36 Wa.R. + + + +. Nach 4 Ascorbin-

säureinjektionen (vom 11. bis 15. 12.) Sättigung. Unterbrechung der Behandlung. Am 15. 12. Wa.R. negativ, am 22. 12. Wa.R. + + + +.

3. 40 Jahre alter kaufmännischer Gehilfe. Am 4. 1. 37 wegen epileptiformer Krampfanfälle der Klinik zugewiesen. Bei der Aufnahme unter anderem: träg reagierende, ungleiche Pupillen; rechts positiv. Babinski. Diagnose: Lues cerebri. Am 8. 1. Wa.R. im Blut und Liquor + + + +. Nach 12 Askorbininjektionen Sättigung. Am 31. 1. Wa.R. noch immer + + + +. Nach 24 Vitamin-C-Injektionen Wa.R. negativ. Inzwischen hatte der Kranke jeden zweiten Tag je eine Pyrifereinjektion erhalten. Daß aber das Negativwerden der Wa.R. nicht dieser Behandlung zu verdanken war, zeigte sich eine Woche nach Aussetzen der Vitamin-C-Behandlung: Wa.R. wieder + + + +.

Woran mag es nun liegen, daß durch die Vitamin-C-Behandlung die bis dahin stets positive Wa.R. negativ wird? Da diese Frage auf Grund der klinischen Beobachtungen allein nicht zu beantworten war, hofften wir, der Lösung derselben durch den *Tierversuch* näher zu kommen. Bei Hunden, die mit Trypanosomen infiziert worden waren, untersuchten wir, ob die positive Wa.R. durch Ascorbinsäure negativ wird, bzw. ob das Zustandekommen der positiven Wa.R. verhindert werden könne. Es erschien uns wichtig, die je einer Versuchsgruppe angehörenden Hunde in gleichem Grade zu infizieren. Den mit Trypanosoma *Prowazeki* infizierten Ratten wurden 10 Tropfen Blut entnommen, in 10 ccm 2% Citrat-Dextrose-Bouillon aufgefangen und das ganze tüchtig durchgeschüttelt. Von diesem Schüttelgemisch erhielt jeder Hund je 1 ccm subcutan. Im allgemeinen betrug das Körpergewicht der Hunde 10 bis 15 kg. Zu den Versuchen wurden natürlich nur Tiere mit bestimmt negativem Blut verwendet. Sobald die Wa.R. nach der Infektion positiv geworden war, begannen wir mit der Behandlung: täglich je 100 mg Vitamin C. Vor der Behandlung und eine Woche nach Beginn derselben wurde das Blut titriert. Der Titer der Wa.R. wies eine Senkung auf; diese konnte aber nicht bloß dem Vitamin C zugeschrieben werden, da sie auch bei den Kontrolltieren erfolgte. Wahrscheinlich kam es bei allen Tieren durch die rasch zunehmende Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes zum Verlust ihrer Reaktionsfähigkeit. Besonders deutlich zeigte sich dies bei der zweiten Versuchsgruppe, bei der die Infektion mit einem stärker virulenten Stamm erfolgte. Hier begannen wir von den 4 infizierten Hunden bei zweien schon am 3. Tage nach der Infektion mit der Ascorbinsäurebehandlung, doch konnte das Positivwerden der Wa.R. nicht verhindert werden. Sowohl bei den behandelten wie auch bei den unbehandelten Tieren wurde die Wa.R. in 2 Wochen positiv, in 3 Wochen wurde sie bei allen Tieren wieder negativ und wenige Tage später verendeten alle Versuchstiere. Zu erwähnen ist, daß es uns nicht gelang, so hohe Wa.R.-Titer zu erreichen wie Kroó, Schulze und Jancsó; wahrscheinlich ist dieser Umstand auf die massive Infektion, auf das schwere Krankheitsbild und auf die rasche Senkung der Reaktionsfähigkeit zurückzuführen.

Auch der Versuch, das Negativwerden der Wa.R. in vitro durch Beimengung von Vitamin C zu erzielen, blieb erfolglos; hier wurde sogar aus der negativen eine positive Wa.R., was damit zu erklären sein dürfte, daß die Ascorbinsäure in einer gewissen Konzentration imstande ist, die Hämolyse — wenn auch nicht ganz zu vereiteln, dennoch — stark zu hemmen.

Die Fragen, weshalb und wieso Vitamin C in dem einen Fall von paroxysmaler Hämoglobinurie wirkungsvoll, im anderen aber unwirksam war, warum die Wa.R. in gewissen Fällen negativ geworden ist, lassen sich demnach heute noch nicht in zufriedenstellender Weise beantworten. Mit Hilfe der In-vitro-Versuche ließ sich zwar mit Sicherheit feststellen, daß Vitamin C seine hemmende Wirkung auf die *Donath-Landsteiner*-Reaktion wie auch auf die Immunhämolyse der Säureeigenschaft verdanke und obwohl die Alkalireserve in unserem geheilten Fall auf 22 Vol.-% sank, während sie in dem anderen Fall trotz der langen Behandlung 55 Vol.-% blieb, kann man sich dennoch kaum vorstellen, daß diese Wirkungen des Vitamins C neben dem großen Puffersystem des Organismus auf einer Säurewirkung beruhen sollte. Zwischen den beiden Hämoglobinuriekranken bestand insofern ein wesentlicher Unterschied, daß bei dem einen — erfolglos behandelten —, wie die Belastung (Sättigungsprobe) zeigte, keine Hypovitaminose nachzuweisen war, da er von den täglich intravenös verabreichten 300 mg Ascorbinsäure schon am 3. Tag 50% ausschied. Aus diesem Ergebnis darf man darauf schließen, daß die C-Hypovitaminose keine entscheidende Rolle bei der Entstehung der paroxysmalen Hämoglobinurie spiele, wie wir dies im Zusammenhang mit dem ersten Kranken annehmen zu dürfen glaubten. Auf der anderen Seite scheint jedoch Vitamin C nur bei Hämoglobinuriekranken erfolgreich zu wirken, die an C-Hypovitaminose leiden. Nicht unerwähnt soll bleiben, daß bei dem zweiten Fall nach dem Aussetzen der Vitamin C-Behandlung die intramuskuläre Wismuttherapie eingeleitet wurde; nach 10 Injektionen hörten sowohl die spontanen wie auch die künstlich hervorgerufenen Anfälle auf, obwohl die Wa.R. auch weiterhin positiv geblieben ist. Es ist kaum zu denken, daß diese ungenügende antiluische Behandlung an sich im Blutchemismus eine Veränderung hervorgerufen habe, die zum Aufhören der Anfälle führen konnte.

Da unsere Tierversuche, in denen uns die Bedingungen der Entwicklung der Wa.R. bekannt waren nicht zu dem gewünschten Ergebnis geführt haben, da man ferner bei dem Negativwerden des Blutes mit der Gesamtwirkung der verschiedensten Faktoren zu rechnen hat, bedarf es in dieser Richtung noch der weiteren Nachforschung.

Zusammenfassung.

Bei dem einen von zwei an paroxysmaler Hämoglobinurie leidenden Kranken, bei dem auch hochgradige C-Hypovitaminose bestand, kam es

nach der Behandlung mit Ascorbinsäure zum Aufhören der Anfälle, bei dem anderen hingegen, bei dem kein Vitamin-C-Mangel nachzuweisen war, erwies sich die Ascorbinsäure allein als unwirksam.

Durch Vitamin C wird *in vitro* die Immunhämolyse gehemmt; dieser Einfluß beruht auf einer Säurewirkung, die durch die Ascorbinsäure hauptsächlich auf den Amboceptor, in geringerem Maße auch auf das Komplement ausgeübt wird. Der Komplementgehalt des Blutes wird auch durch eine länger dauernde Vitamin-C-Verabreichung nicht beeinflusst.

Unter 32 Lueskranken wurde in drei Fällen die Wa.R. auf Ascorbinsäurebehandlung vorübergehend negativ. Bei mit Trypanosomen infizierten Hunden, ferner bei den *In-vitro*-Versuchen, gelang es jedoch nicht, die positive Wa.R. zu beeinflussen.

Schrifttum.

- Armentano, L.: *Nature* **137**, Nr 3474 (1936). — *Z. klin. Med.* **129**, 685 (1936). —
Armentano L. u. A. Bentsdth: *Klin. Wschr.* **1936 II**, 1594. — Capelli, F.: *Pathologica*
(Genova) **14**, 28, Nr 539 (1936). — Kroó, H., F. O. Schulze u. N. j. Jancsó: *Klin.*
Wschr. **1930 II**, 1108. — Lotze, H.: *Klin. Wschr.* **1936 I**.
-